рус, изолированный в 2005 г. обладает большей репродуцирующей активностью по сравнению с вирусом 1961 г. Отработаны оптимальные условия криоконсекрвации для сохранения генофонда Коллекционных линий.

SUMMARY

There are present continuous cell lines sensitive to RNA and DNA viruses. It is studied reproduction of avian influenza viruses (H5N1 and H5N3) in 16 types of cells. It is shown that virus, which was isolated in 2005 year, has more reproductive activity, than virus of 1961 year. Were work out the optimal conditions of cryoconservation for genofond maintenance collection cell lines.

Литература

1. Каталог Всесоюзной Коллекции клеточных культур. Л.: Наука, 1991.
2. Каталог Российской Коллекции клеточных культур (РККК). С. Петербург, Омск, 1999.
3. Human and animal cell lines catalog. Ed B Parodi et al, Italy. 1993.
4. Подчерняева Р.Я., Исаева Е.И., Данлыбаева Г.А., Михайлова Г.Р. Репродукция вирусов гриппа в культуре клеток мозга хорька Mpf (Mustela putorius furo) // Ветеринарная патология, 2006, С. 107-111.

Н.П. Глинских, А.А. Бахарев, П.В. Устьянцев, И.В. Устьянцев
ФГУН Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций Роспотребнадзора

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРИОБАНКОВ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР В ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Успех решения проблем теоретической и прикладной вирусологии и биотехнологии зависит от качественной характеристики клеточных культур, используемых в экспериментальной, диагностической и производственной работе. В культурах, поддерживаемых путем длительного серийного пассирования, наблюдается выраженная тенденция к непрерывному изменению основных характеристик, что обусловлено целым рядом факторов: составом и качеством питательных сред и сыворотки, условиями и режимом культивирования. Изменения затрагивают чаще всего культуральные свойства клеточных линий, но нередки и более глубокие сдвиги, вплоть до изменения кариотипа и видовой принадлежности вследствие контаминации клеток в процессе пассирования. С учетом этого особое значение приобретает не только вопрос получения клеточных культур для обеспечения тех или иных экспериментально - диагностических исследований и производственных разработок, но и задача сохранения таких культур с неизменными биологическими характеристиками. Поэтому вполне закономерной является постановка вопроса о создании отраслевых стандартов клеточных культур с регламентированными биологическими свойствами, определяющими качественный уровень проводимых исследований. Эти стандарты должны отразить главные требования к клеточному субстрату и выделить основные критерии для паспортизации переживаемых клеточных линий и штаммов.

Исследования по отдельным разделам стандартизации клеточных культур, используемых в вирусологии, были начаты в 1996 г. в соответствии с задачами, стоящими перед Екатеринбургским НИИВИ как головным учреждением Минздрава России по проблеме «Вирусология и вирусные заболевания». Проведены, в частности, исследования по разработке условий получения стабилизированных линий клеток; методов деконтаминации клеточных культур от микоплазм; анализу криоустойчивости клеточных культур с целью выбора оптимального режима их консервации. Одной из конечных целей этих разработок являлось создание условий обеспечения вирусологических лабораторий России стабилизированными клеточными культурами. Поэтому исследования, посвященные проблеме стандартизации клеточных культур в последующем были расширены и проведены по следующим направлениям: оптимизация условий культивирования перевиваемых клеток на основе стандартизации естественного компонента сред роста и выбора критериев оценки качества питательных сред; разработка условий получения линий перевиваемых клеток, отличающихся выраженной стабильностью своих морфофизиогических свойств и высокой чувствительностью к вирусам;

разработка принципов паспортизации клеточных культур и создание паспорта-каталога имеющихся в институте перевиваемых клеточных линий и штаммов; накопление низкотемпературного фонда стабилизированных клеточных культур с учетом данных анализа влияния сверхнизких температур (-196° С) на биологические свойства клеток, оценки обратимости криогенных повреждений и выбора критериев контроля клеток при отработке оптимальных режимов их криоконсервации.

Важным элементом стандартизации сывороточного компонента сред культивирования была разработка и совершенствование технологии получения лиофилизированой сыворотки крупного рогатого скота. Явным преимуществом использования сухого препарата является его длительный срок годности, что обеспечивает создание стандартных условий поддержания клеток на протяжении длительного периода работы.

Микоплазма – инфекция поражает все типы клеточных культур: первичные культуры – около 4%, перевиваемые – до 57-92%. Латентная микоплазменная инфекция культур клеток не сопровождается видимыми морфологическими изменениями, но может влиять на характер роста клеток: его замедление и ухудшение адгезивной способности клеток. Острая микоплазма - инфекция вызывает резкое закисление среды, раннее отторжение от стекла с образованием дефектов монослоя уже на 3-4 сутки роста. Происходит изменение морфологии клеток: зернистость цитоплазмы, кариорексис и пикноз ядер.

Деконтаминация клеток от микоплазм приводит к нормализации морфологии клеток, что убедительно показали электронно-микроскопические наблюдения. Происходит повышение их митотической активности и нормализации процесса деления. Вмешательство микоплазм в развитие процессов клеточного деления, безусловно, не может не отразиться на процессах взаимодействия клеток с вирусами, о чем свидетельствуют наши исследования. Для деконтаминации клеточных культур от микоплазм был использован ряд традиционных методов, существенно модифицированных, применительно к нашим условиям работы. При использовании метода подавления роста микоплазм антибиотиками было отмечено, что оптимальной является обработка культур гентамицином или сочетанием канамицина с тетраолеаном и линкомицином. Антибиотики добавляли в суспензию клеток при их пересеве в течение 3-5 пассажей.

Успех деконтаминации зависит от качества контроля клеток на микоплазмы. В настоящее время разработано достаточное количество методов индикации микоплазм в клеточных культурах: гистохимические, иммунологические, биохимические, авторадиографические методы, уридин-урациловый метод и метод электронной микроскопии. По нашим данным, метод электронной микроскопии в технике ультратонких срезов и негативного контрастирования является одним из достоверных для контроля качества деконтаминации. Электронная микроскопия ультратонких срезов клеток культуры ткани дает представление не только о наличии микоплазменных и вирусных образований, но и об изменении структурных элементов клетки.

Контаминация клеточных культур вирусами выявляется с большим трудом и может длительное время оставаться незамеченной. Для этих целей разработана оригинальная методика смешанного культивирования исследуемых клеток с клетками, чувствительными к различным вирусам (например, первичные клетки почек новорожденных крольчат или почек эмбриона человека). Кроме того, использованы реакция гемадсорбции с эритроцитами кур, морской свинки и 0-группы человека, метод иммунофлуоресценции и электронной микроскопии в технике негативного контрастирования.

Факт выявления посторонних вирусов в культурах клеток нами был отмечен только в случае заноса их с сывороткой крови крупного рогатого скота, используемой для поддержания клеточных линий. Онкорнавирусы типов А, С или В были выявлены в 90% исследуемых культур.

С целью выявления контаминации клеточных культур одних видов клетками других видов и внутривидовой контаминации линий клеток человека была изучена кариотипическая характеристика и проверен анализ изоэнзимов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы перевиваемых кле-

ток человеческого и животного происхождения, отличающихся по длительности культивирования in vitro. Идентификация клеток при помощи электрофоретических вариантов ферментов позволила выявить контаминацию некоторых культур человеческого и обезьяньего происхождения клетками мыши. Сочетанное использование указанных методов позволяет провести достаточно четкую дифференцировку клеток по их видовой принадлежности.

Была использована количественная кариотипичская характеристика клеточных культур как один из критериев их специфичности. Применяли также метод дифференциальной окраски хромосом при анализе клеточных культур, составляющих фонд низкотемпературного банка. В результате использования комплекса этих методов нам удалось выявить изменение видовой принадлежности линии клеток СОЦ, А-1 (амнион человека), которые оказались контаминиро-ванными клетками мышиного типа, клетки линии ФК (фиробласты крысы) оказались котаминированными клетками типа HeLa. Окраска по С-методу показала, что кариотип клеток СОЦ и А-1 представлен акроцентрическими хромосомами, характерными для клеток мышиного происхождения.

Поиски путей стабилизации свойств перевиваемых клеток привели к необходимости разработки оптимальных условий их длительной консервации в жидком азоте (-196° С).

Использование низких температур для консервации тканевых и клеточных культур обусловило целесообразность проведения анализа характера и длительности адаптационного периода клеток, восстановленных после хранения в замороженном состоянии, с целью выбора критериев оценки их криоустойчивости.

Наши эксперименты показали, что криоустойчивость клеток в значительной степени обусловлена морфо-физиологическими особенностями культуры. Поэтому для создания фонда клеточных культур необходимо было использовать клоновые линии клеток, свободные от микоплазм-контаминантов и посторонних вирусов, что является одним из обязательных условий стабилизации биоологических характеристик клеток.

Результаты, полученные нами с использованием стабилизированных линий клеток СПЭВ, HeLa и НЕр-2 показали, что в период адаптации клеток после длительного хранения в жидком азоте происходит повышение пролиферативного пула и интенсивности генерационных процессов востановленной культуры. Сделан вывод о более высокой криоустойчивости клеток стволовой линии. В качестве критериев оценки криоустойчивости клеток были использованы данные их ультраструктурной характеристики, показатели интенсивности клеточного деления, продолжительность генерационного цикла, кариотипическая характеристика популяции. Сделано экспериментальное обоснование выбора оптимальных режимов замораживания клеток при создании низкотемпературного банка-музея клеточных культур. Показано, что выживаемость клеток в условиях глубокого охлаждения зависит от их исходных физиологических свойств, состава консервирующей среды, а также режима замораживания.

Ультраструктура восстановленных после криоконсервации клеток резко отличается от контрольных, не подвергавшихся замораживанию: хроматин образует хлопья на фоне просветленного матрикса ядра, ядерная мембрана местами расслаивается, цитоплазма вакуолизирована, митохондрии набухшие с фрагментированными кристами, рибосомы свободно располагаются в матриксе цитоплазмы. Эти явления обратимые. Клетки 3-5-го пассажа после восстановления уже не отличаются от клеток исходной культуры. Индекс пролиферации восстановленной культуры соответствует исходному, характерному для данной линии клеток.

Исследованные нами линии клеток отличались присущим им спектром чувствительности к вирусам человека. Чувствительность клеточных линий к вирусам ЕСНО, Коксаки А и В, респираторно-синцитиальному и парагриппозным вирусам, аденовирусам и арбовирусам в процессе длительного хранения в жидком азоте практически не изменялась.

Проведение паспортизации клеточных культур, входящих в фонд банка-музея клеточных культур, явилось одним из первых начинаний в плане организации специализированной коллекции клеточных культур, используемых в практической вирусологии и биотехнологии.